

09/762850

REC'D 23 NOV 1999

WIPO PCT



EP 99/5867

EU

Bescheinigung

Herr Professor Dr. Ulrich Z i m m e r m a n n in Waldbrunn/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Verfahren zur Gewinnung hochgereinigter Alginat"

am 14. August 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole C 08 B, C 08 L und A 61 K der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 30. September 1999
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Hiebinger

Aktenzeichen: 198 36 960.3

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Verfahren zur Gewinnung hochgereinigter Alginat

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung hochgereinigter Alginat, insbesondere aus Braunalgen, und mit diesem Verfahren hergestellte Alginat mit einem hohen Polymerisationsgrad sowie deren Verwendung.

Alginat besitzen zahlreiche Anwendungen im Bereich der Lebensmitteltechnik (z.B. Askar in "Alimenta", Bd. 21, 1982, S. 165 ff.) und in der Textiltechnik, in zunehmendem Maße jedoch auch in der Pharmazie, Medizin, Biochemie und Biotechnologie. Die nach den bisher bekannten Verfahren aus Algenpflanzen gewonnenen Alginat (Übersicht beispielsweise in D.J. McHugh: "Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds" in "FAO Fisheries Technical Papers", Bd. 288, 1987, Cap. 2) sind durch Schwankungen der Zusammensetzung und der Struktur sowie durch Verunreinigungen gekennzeichnet. Dies ergibt sich daraus, daß das Rohalginat aus Biomasse extrahiert wird, die aus Wildpopulationen gewonnen wird. Die insbesondere in Küstengewässern wachsenden Algenpopulationen sind zahlreichen geographischen, saisonalen und stofflichen (Umweltverschmutzung) Einflüssen ausgesetzt. Hinzu kommt, daß bei der Ernte die Algen ggf. gemeinsam mit Fremdstoffen eingesammelt und zur Konservierung bzw. zur Entfärbung einer chemischen Behandlung (z.B. mit Formalin und/oder Hypochlorid) unterzogen werden.

Die bis jetzt verfügbaren Rohalginat sind daher Mischpolymere variabler Struktur mit Verunreinigungen, zu denen insbesondere toxische Chemikalien zählen können. Da in der Lebensmittel- und Textiltechnik vorrangig Interesse an den gelbil-

denden Eigenschaften der Alginat²e besteht, wurden Verfahren zur Nachreinigung oder Reinigung der Rohalginat²e, wie sie im folgenden erläutert werden, erst für die biologisch-medizinischen Anwendungen entwickelt.

Verfahren zur Reinigung von Alginaten (wie sie z.B. von den Unternehmen Keltone LV oder Kelco Nutrasweet verfügbar sind) werden beispielsweise in DE-US 4,204,012, US-A 5,429,821 (bzw. US-A 5,656, 468) und in der Publikation von P. De Vos et al. in "Diabetologia" (Bd. 40, 1997, S. 262 ff.) beschrieben. Diese Verfahren besitzen generell die Nachteile eines hohen Energieaufwandes (Anwendungen einer Elektrophorese, Gefriertrocknung oder Zentrifugation, Erhitzung oder Kochen), einer hohen Umweltbelastung (Verwendung von Säuren wie HCl, H₂SO₄, biologisch nicht-abbaubaren Lösungsmitteln wie CHCl₃ oder Schwermetallionen wie beispielsweise Barium, Blei oder Kadmium) und einer Beschränkung des erzielbaren mittleren Molekulargewichts des gereinigten Endmaterials. Weitere Nachteile der herkömmlichen Verfahren ergeben sich im einzelnen aus den folgenden Erläuterungen:

Bei dem aus DE-OS 42 04 012 bekannten Verfahren wird eine Rohalginatlösung einer Behandlung mit einem Komplexbildner, einer Säureextraktion bei hohen Temperaturen (rund 70 °C), einer Waschung, einer Behandlung mit konzentriertem Alkohol (rund 80 %) und einer weiteren Behandlung mit einem Komplexbildner ausgesetzt. Anschließend folgt ein Dialysevorgang und eine Gefriertrocknung (oder Elektrophorese oder Zentrifugation) zur Gewinnung des gereinigten Alginats. Dieses Verfahren ist wegen des hohen Energieaufwands, der großen Anzahl von Verfahrensschritten, dem Einsatz von toxischen Materialien (z.B. Barium als Komplexbildner) und der Beschränkung auf Alginat²e (< 500 kD) nachteilig. Ein besonderes Problem ist jedoch, daß der Reinigungseffekt dieses Verfahrens nur beschränkt ist.

11.03.99

In DE-OS 42 04 012 werden die gereinigten Alginatate zwar als mitogenfreie Substanzen benannt, dies jedoch lediglich unter der Annahme einer Mitogenfreiheit, falls in vorbestimmten Tierversuchen keine Entzündungsreaktionen beobachtet werden, sowie einer Unbedenklichkeit weiterer Komponenten, die im hochgereinigten Alginat verblieben. Es hat sich jedoch gezeigt, daß die am Ende der 80er Jahre entwickelten und in DE-OS 42 04 012 implementierten Tierversuche nicht geeignet sind, eine Mitogenfreiheit nachzuweisen, die den Anforderungen der modernen biomedizinischen Anwendungen, z.B. der Implantationstechnik, erfüllt. So wurden die Tierversuche beim herkömmlichen Reinigungsverfahren mit sogenannten Lewis-Ratten durchgeführt. Inzwischen konnte jedoch durch G. Klöck et al. in "Biomaterials" (Bd. 18, 1997, S. 707ff) und durch P. Gröhn (Dissertation Universität Würzburg, 1998) nachgewiesen werden, daß die Lewis-Ratten eine relativ geringe Empfindlichkeit gegenüber nitogenen Substanzen besitzen. Implantierte Alginat-Kapseln, die bei Lewis-Ratten nach drei Wochen keine Entzündungsreaktionen auslösten, führten beispielsweise bei sogenannten BB-OK-Ratten ("Bio Breeding / Ottawa Karlsburg") zu Entzündungsreaktionen. Daraus ergibt sich, daß die aus DE-OS 42 04 012 bekannten mitogenfreien Substanzen tatsächlich nicht als hochgereinigt betrachtet werden können und wegen verminderter Biokompatibilität bei biomedizinischen Anwendungen nur beschränkt einsetzbar sind.

Bei dem aus US-A 5,429,821 bzw. US-A 5,656,468 bekannten Reinigungsverfahren wird ebenfalls eine Säurefällung durchgeführt. Es sind wiederum Hochtemperaturverfahrensschritte und zur endgültigen Alginatgewinnung eine Zentrifugation, Elektrophorese oder Gefriertrocknung erforderlich. Die nach diesem Verfahren gewonnenen Alginatate sind auf Molekulargewichte unterhalb 200 kD beschränkt. Es folgt eine Trocknung bei 80°C, bei der im Mischpolymer Trocknungsartefakte durch Struktur- oder Stoffumsetzungen entstehen können.

11.03.1999

Ein besonderes Problem stellt die Beschränkung auf relativ geringe Molekulargewichte dar. So ist beispielsweise aus "Immobilized Enzymes" von J. Chibata (A Halsted Press Book, John Wiley & Sons, 1978) bekannt, daß die Bio-Toxizität von Materialien mit der Zunahme des Molekulargewichts abnimmt.

Schließlich ist auch das oben genannte Verfahren nach P. de Vos et al. durch zahlreiche Verfahrensschritte, einschließlich einer Säurefällung, dem Einsatz toxischer Chemikalien (Chloroform), die Verwendung hochkonzentrierten Ethanol (rund 70%) und die Anwendung einer Zentrifugation, Elektrophorese oder Gefriertrocknung gekennzeichnet.

Ein weiterer Nachteil sämtlicher Reinigungsverfahren besteht in deren Beschränkung auf die Reinigung kommerziell verfügbarer Rohalginat. Die Verfahren sind nicht auf Frischmaterial oder geerntete Biomasse anwendbar. Außerdem sind die Verfahren aufgrund der umständlichen Verfahrensführung, des Energieaufwands und dem Einsatz toxischer Chemikalien für eine großtechnische Anwendung nicht praktikabel.

Die Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zur Gewinnung hochgereinigter Alginat anzugeben, mit dem die Nachteile herkömmlicher Reinigungsverfahren vermieden werden und die Herstellung eines hochgereinigten Alginats, insbesondere in großtechnischem Maßstab, ermöglicht wird. Die Aufgabe der Erfindung ist es auch, ein neuartiges Alginat und gegenüber den herkömmlichen Alginaten erhöhtem Molekulargewicht anzugeben.

Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren bzw. eine Alginatzusammensetzung mit den Merkmalen gemäß den Patentansprüchen 1 bzw. 14 gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen und Verwendungen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

4031199

Unter einem hochgereinigten Alginat wird hier eine reproduzierbar herstellbare Alginatzusammensetzung verstanden, die vorbestimmte Molekulargewicht- und/oder Viskositätsparameter besitzt und eine hohe Sterilität, Reinheit und Biokompatibilität aufweist. Letzteres Merkmal bezieht sich beispielsweise auf eine reproduzierbar herstellbare Alginatzusammensetzung, die vorbestimmte Molekulargewicht- und/oder Viskositätsparameter besitzt und eine hohe Sterilität, Reinheit und Biokompatibilität aufweist. Letzteres Merkmal bezieht sich beispielsweise darauf, daß mit erfindungsgemäß hochgereinigten Alginaten in autoimmundiabetischen BB/OK-Ratten auch nach mehrwöchiger Implantation keine oder eine vernachlässigbar geringe Fremdkörperreaktion ausgelöst wird.

Im Unterschied zu den herkömmlichen Reinigungsverfahren, die sämtlich an kommerziell verfügbare Rohalginat angepaßt sind, die jedoch Verschnitte oder Mischungen aus verschiedenen Algenmaterialien unter Einschluß von tierischen oder anderen Fremdmaterialien darstellen und somit grundsätzlich nicht hochgereinigtes Alginat ergeben können, wird erfindungsgemäß eine Alginatherstellung oder -gewinnung angegeben, die vorzugsweise von sauberem Algenfrischmaterial oder getrocknetem Algenmaterial als Ausgangsstoff ausgeht. Es ist insbesondere vorgesehen, daß zunächst das Algenmaterial in Gegenwart von Komplexbildnern behandelt wird, worauf mit einem Bindemittel in Form eines Granulats oder einem vergleichbaren porösen Material Zellbestandteile und Partikel sedimentiert werden. Nach einer Filtration erfolgt ein Fällungsschritt, vorzugsweise unter gleichzeitigem Einblasen eines Trägergases, unter dessen Wirkung das ausgefällte Alginat auf der Lösung aufschwimmt. Dieses Aufschäumen (Floatieren) ist nicht zwingend erforderlich. Ausgefälltes Alginat kann auch anderweitig aus der Lösung getrennt werden (z.B. durch einen Dekantiervorgang). Das derart gewonnene Alginat kann von der Lösungsoberfläche abgenommen oder als Rückstand nach dem Dekantieren

11.03.99

aufgenommen und an Luft oder mit einer Filterpresse entwässert werden. Je nach Anwendungsfall wird dieser Reinigungsvorgang mehrfach bzw. Teilschritte dieses Reinigungsvorgangs einmalig oder mehrmals wiederholt. Nach der letzten Reinigung erfolgt ein abschließendes Waschen und Lufttrocknen.

Diese Verfahrensweise besitzt die folgenden Vorteile. Bei der Alginatgewinnung wird vollständig auf toxische Chemikalien und Hochtemperaturbedingungen verzichtet. Die Verfahrensschritte können ohne Probleme in verhältnismäßig kleinem Maßstab, z.B. am Ort der Algenernte, oder auch großtechnisch durchgeführt werden. Durch gezielte Steuerung der Fällungsreaktion werden Verunreinigungen durch Fucoidan ausgeschlossen, so daß sich die Reinheit des gewonnenen Alginats im Vergleich mit herkömmlichen Alginaten verbessert.

Die unmittelbare Verarbeitung von Algenmaterial besitzt eine Reihe von Vorteilen. Erstens werden Nachteile bei der herkömmlichen Algenernte, die sich durch Zersetzung und Verrottung am Ernteort und die konservierende Chemikalienbehandlung ergeben, vollständig vermeidbar. Zweitens lassen sich die geernteten Algen nach Organen oder Gewebeabschnitten trennen, bevor die Alginatgewinnung durchgeführt wird. Da sich die verschiedenen Algengewebe durch verschiedene Verhältnisse der monomeren Mannuronsäure und Guluronsäure unterscheiden, können gezielt hochgereinigte Alginat mit einer bestimmten Mannuron-Guluron-Zusammensetzung hergestellt werden. Entsprechendes gilt für die Wahl bestimmter Gewebeteile zur Erzielung eines bestimmten Molekulargewichts. Es lassen sich erfindungsgemäße Alginatzusammensetzungen mit einem Molekulargewicht von mehr als 1.000 kD gewinnen. Schließlich kommt das erfindungsgemäß Verfahren ohne aufwendige Zentrifugations-schritte aus, wodurch die praktische Implementierung weiter vereinfacht wird. Die gezielte Gewinnung verschiedener Sorten hochreinen Alginats (z.B. guluronat- bzw. mannuronatreiches

Alginat) läßt sich auch durch gezielte Gewinnung aus bestimmten Algenspezies (*Laminariales*, *Ectocarpales*, *Fucales*) realisieren, die sich durch die chemische Struktur des jeweiligen Alginats unterscheiden. Bei der organspezifischen Selektion werden hingegeben Phylloide, Cauloide und Rhizoide der Algen getrennt und separat verarbeitet. Diese Differenzierung kann weiter verfeinert werden, in dem einzelne Gewebe der verschiedenen Organe getrennt und das Alginat aus diesen Geweben separat gewonnen wird.

Die Erfindung ist insbesondere zur Alginatgewinnung aus frischem oder getrockneten Algenmaterial (insbesondere Braunalgen) angepaßt. Es ist jedoch auch möglich, mit dem erfindungsgemäß Verfahren kommerziell verfügbare Rohalginat zu reinigen oder das erfindungsgemäß Verfahren mit bestimmten Wasch- oder Trennschritten (z.B. Zentrifugation) zu kombinieren, die aus den herkömmlichen Reinigungsverfahren bekannt sind.

Ein weiterer Vorteil der Erfindung besteht darin, daß das hochreine Alginat unmittelbar aus den Algenpflanzen unter Kontrolle sämtlicher Prozeßschritte gewonnen wird. Es werden toxische Chemikalien (insbesondere Lösungsmittel) vermieden, so daß ein Einsatz für pharmazeutische Zwecke ohne weiteres möglich ist. Das Aufschäumen des ausgefällten Alginats stellt ein besonders einfaches und energiearmes Abtrennverfahren dar.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden die folgenden Verfahrensschritte zunächst an Algenfrischmaterial oder getrocknetem Material durchgeführt und anschließend an hochgereinigtem Alginat teilweise wiederholt, das beim ersten oder früheren Verfahrensabläufen gewonnen wurde.

Das Algenmaterial bzw. kommerzielle Alginat wird im folgenden als Ausgangsmaterial bezeichnet. Zunächst wird das Ausgangs-

11.03.11.99

material in Gegenwart von Komplexbildnern in einer Sodalösung extrahiert. Anschließend werden in der Lösung vorhandene Zellbestandteile und Partikel durch Zugabe eines Granulats und falls erforderlich durch Zugabe von Ionenaustauschern (wie z.B. Amberlit) zur Sedimentation gebracht und die Lösung anschließend gefiltert. Die Sedimentation kann alternativ auch unter Verwendung von Elektrographit (z.B. in Kügelchen-Form) vorgenommen werden. Dabei wird Elektrographit in die Lösung eingerührt und durch einen Stromfluß zwischen zwei in die Lösung eingehängten Elektroden aufgeladen. Die geladenen Elektrographitkügelchen zeigen eine Akkumulation von Verunreinigungen, die hier die betreffenden Zellbestandteile und Fremdpartikel umfassen. Der Filterschritt kann eine mehrfache Filterung mit schrittweise sich verringernder Porengröße z.B. von 15 µm bis 0.1 µm umfassen. Aus der gefilterten Lösung wird das Alginat durch ein geeignetes Fällungsmittel ausgefällt. Die Fällung wird vorzugsweise mit einem Alkohol (z.B. Ethanol) durchgeführt. Es kann aber auch eine Säure oder ein anderes geeignetes Fällungsmittel verwendet werden. Die Alkoholkonzentration wird im Bereich zwischen 10% bis 50%, vorzugsweise im Bereich von 20% bis rd. 30% gewählt. In diesem Konzentrationsbereich bleiben Verunreinigungen durch immunologisch aktive Polysaccharide wie z.B. Fucoidan in der Lösung und können somit vom Alginat getrennt werden. Falls höhere Alkoholkonzentrationen wie z.B. beim Verfahren nach De Vos et al. verwendet werden, so können diese unerwünschten Polysaccharide nicht abgetrennt werden. Während der Ausfällung erfolgt vorzugsweise eine Durchströmung der Lösung mit einem Treibgas (z.B. Luft). Das ausgefällte Alginat wird durch die eingeblasene Luft nach oben aufgetrieben und kann von der Lösungsoberfläche leicht mit einer geeigneten Einrichtung (z.B. Netz, Sieb oder dergl.) von der Lösung abgetrennt werden. Anschließend wird das gesammelte Alginat mit einer Filterpresse entwässert.

Die genannten Verfahrensschritte werden anwendungsabhängig ganz, teilweise oder in teilweise modifizierter Form wiederholt. Nach dem letzten Verfahrensablauf wird das hochgereinigte Alginat in Ethanol und ggf. anschließend in Wasser gewaschen und bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

Das gereinigte Alginat besitzt in Abhängigkeit vom Ausgangsmaterial ein Verhältnis der Monomeren Mannuronsäure und Guronsäure im Bereich von 0.1 - 9 (entsprechend 1% bis 90% Mannuronsäure) und ein mittleres Molekulargewicht von ca. 10 kD bis mehr als 1000 kD. Derart gereinigtes, bei einer autoimmundiabetischen BB/OK Ratte implantiertes Alginat löst nach einer Implantationszeit von 3 Wochen keine oder nur eine sehr schwache Fremdkörperreaktion aus, wie im einzelnen unten erläutert wird.

Beispiel

Das Ausgangsmaterial umfaßt (1) frische Braunalgen, (2) getrocknete Braunalgen oder (3) kommerzielles Alginat. Im Falle von (2) und (3) wird das trockene Material (z.B. *Laminariales*, *Fucales*) je nach Ausgangsmenge für mehrere Stunden in warmem Leitungswasser gewässert. Dies kann beispielsweise bei Leitungswasser mit einer Temperatur von 40°C mindestens 3 bis 4 Stunden dauern, wobei das Wasser mehrfach ausgetauscht wird oder fließt. Bei Verwendung von kälterem Wasser muß die Wässerung entsprechend verlängert werden. Die Wässerung erfolgt vorzugsweise dadurch, daß das Material in einem wasserdurchlässigen Behältnis (z.B. wasserdurchlässiger Sack) in fließendes Leitungswasser gehängt wird. Bei Wässerung in stehendem Wasser wird das Material bei einem Ausgangstrockengewicht von rund 80 g getrocknete Algen (entsprechend 10% des Frischgewichts von rund 800 g) in 3 bis 6 l Wasser gewässert.

Nach der Wässerung erfolgt die Verfahrensweise für alle drei genannten Arten von Ausgangsmaterial (1) bis (3) analog, wo-

bei hier beispielhaft auf 80 g trockene und anschließend wieder hydratisierte (gewässerte) Algen Bezug genommen wird. Bei kommerziellem Alginat, dessen Trockengewicht nur rund 1% des Frischgewichts ausmacht, wird entsprechend weniger Trockengewicht eingesetzt.

Das Material wird in rund 5.7 l einer 25 mM EDTA-Lösung (Aqua dest. bzw. demineralisiertes Wasser) suspendiert (bzw. im Falle von kommerziellem Alginat (3) gelöst). Die Einwirkung der Ethylendiamintetraessigsäure(EDTA)-Lösung erfolgt mindestens 10 Stunden. Die Einwirkungszeit kann verkürzt werden, wenn die Suspension laufend gerührt wird. Mit steigender Einwirkungszeit verbessert sich die Ausbeute an gereinigtem Alginat. Bei einer ungerührten Suspension kann beispielsweise eine Einwirkungszeit von mehreren Tagen vorgesehen sein.

Anschließend werden 5% Na_2CO_3 und EDTA als Festsubstanzen unter Rühren zugegeben. Die EDTA-Menge wird derart gewählt, daß eine 50 mM-EDTA-Lösung gebildet wird. Die Suspension wird solange gerührt, bis eine homogene (feindisperse) Lösung vorliegt. Dieser Zustand ist insbesondere dann erreicht, wenn in der Lösung nur noch wenige Zellbestandteile sichtbar sind. Anschließend werden rund 34.2 g Kieselgur unter Rühren zugeetzt und die Lösung für mindestens 2 Tage gerührt. Es ist alternativ möglich, das Kieselgur zusammen mit Na_2CO_3 und EDTA unter Rühren zuzugeben. Es kann anwendungsabhängig (insbesondere in Abhängigkeit vom verwendeten Braunalgenmaterial) vorgesehen sein, zusätzlich Ionenaustauschermaterial gleichzeitig mit dem Kieselgur oder Elektrographit zuzugeben. Es ist beispielsweise möglich, zusätzlich 34.2 g Amberlit als Ionenaustauscher zuzusetzen, das vorher einer Reinigung unterzogen worden ist. Diese Reinigung dient der Entfernung toxischer Substanzen und umfaßt eine Besserung in fließendem Wasser (Dauer rund 3 Stunden).

Nach der Kieselgurbehandlung wird das Volumen der Lösung mit demineralisiertem Wasser auf 22.8 l verdünnt, um die Viskosität zu verringern. Die Verdünnung wird allgemein derart gewählt, daß die Lösung anschließend filtrierbar ist. Der Wasserzusatz hängt somit insbesondere auch vom verwendeten Braunalgenmaterial ab. Nach der Verdünnung und kurzzeitigem Durchrühren wird die Lösung für mindestens 10 Stunden stehengelassen, um feste Bestandteile sedimentieren zu lassen. Die Standzeit kann auch im Bereich von Tagen liegen. Der Überstand wird abdekantiert und filtriert. Die Filtration erfolgt mehrstufig, wobei erst ein Tiefenfilter mit einer Porengröße von 15 µm und anschließend ein Filter mit einer Porengröße von 0.1 µm verwendet wird.

Anschließend folgt ein Salzzusatz zu dem Filtrat. Es wird der Zusatz von KCl bevorzugt, wobei anwendungsabhängig auch andere, entsprechende Salze eingesetzt werden können. Es wird soviel KCl als Festsubstanz zugegeben, daß sich eine 0.13 M KCl-Lösung ergibt.

Anschließend folgt eine Ethanol-Fällung. Die Menge des Ethanolzusatzes hängt davon ab, wieviel Fucoidan sich im Material befindet. Die Ethanolkonzentration sollte bei Anwesenheit von Fucoidan nicht 30% überschreiten, da sonst das Fucoidan mit ausfällt. Beim angegebenen Beispiel werden rund 12 l 99%iger Ethanol zugesetzt, so daß die Endkonzentration des Ethanol in der Gesamtlösung bei rund 28% liegt. Es kann auch vorgesehen sein, daß die Ethanolkonzentration in Abhängigkeit von der Art des Ausfällens des Alginats gewählt wird. Durch Variation der Ethanolkonzentration kann erzielt werden, daß das Alginat fadenförmig oder watteförmig ausfällt. Eine derartige Ausfällung wird nach Möglichkeit angestrebt, damit das Alginat aufschwimmt bzw. weiterverarbeitet werden kann, wie dies unten erläutert wird.

Anstelle von Ethanol kann auch mindestens ein anderer Alkohol oder eine Fällungssäure zugegeben werden, wobei die Konzentration sich nach den genannten Kriterien richtet.

Während der Fällung erfolgt eine Durchströmung der Lösung mit einem Treibgas (z.B. Luft). Das ausgefällte Alginat wird während der Fällung, d.h. im Entstehen, durch die eingeblasene Luft nach oben aufgetrieben und kann von der Lösungsoberfläche leicht mit einer geeigneten Einrichtung (z.B. Netz, Sieb, oder dgl.) von der Lösung abgehoben werden. Das ausgefällte Alginat kann auch ohne Treibgaszusatz durch Dekantieren gesammelt werden. Anschließend wird das gesammelte Alginat mit einer Filterpresse entwässert, um dem stark hygroskopischen Material zumindest teilweise Wasser zu entziehen.

Die bis hier realisierten Verfahrensschritte werden anwendungsabhängig ganz, teilweise oder teilweise unter modifizierten Bedingungen wiederholt. Danach wird eine Weiterverarbeitung des gefällten Alginats wie folgt durchgeführt.

Das gefällte Alginat wird in 11.4 l und 0.5 M-KCl/10 mM-EDTA-Lösung aufgelöst. Die Auflösung erfolgt unter Rühren, bis eine homogene Lösung vorliegt. Anschließend folgt eine zweite Fällung mit rund 10 l einer 99%igen Ethanollösung unter Treibgaszuführung. Unter diesen Bedingungen beträgt die Alkoholkonzentration in der Gesamtlösung rund 44%. Bei dieser zweiten Fällung kann eine höhere Alkohol-(bzw. Säure-)Konzentration gewählt werden, da das Fucoidan (siehe oben) bereits abgetrennt ist. Allerdings wird die Konzentration des Fällungsmittels wiederum so eingestellt, daß die Bildung von faden- oder watteartigem Alginat gefördert wird. Bei nicht-optimaler Alkoholkonzentration ist das Alginat gelatineartig und kann somit nicht flotiert werden (Aufschwimmen unter Treibgaswirkung).

Anschließend wird das gefällte Alginat wieder durch eine Filterpresse entwässert und mehrmals mit der 10-fachen Menge einer 70%igen Ethanolllösung gewaschen. Anschließend wird das Material bei Raumtemperatur getrocknet. Die Trocknung kann anwendungsabhängig unter sterilen Bedingungen erfolgen. Es kann nach der Waschung mit Ethanol vorgesehen sein, das Material mehrfach mit demineralisiertem Wasser zu waschen oder gegen demineralisiertes Wasser zu dialysieren, um Restspuren von Ethanol zu entfernen.

Die Zahl der erfindungsgemäß durchgeführten Fällungen richtet sich nach den Verunreinigungen bzw. den toxischen Beiprodukten im Ausgangsmaterial.

Die Gewebeverträglichkeit des entsprechend dem Beispiel gewonnenen Alginats wird wie folgt geprüft. Es werden Implantationsexperimente mit normoglykämischen (6.1 ± 0.4 mM Plasmaglucose), diabetesanfälligen BB/OK-Ratten (200 + 25 Tage alt) durchgeführt. Diese Ratten besitzen eine erheblich höhere Empfindlichkeit gegen Verunreinigungen in Alginaten als die oben genannten Lewisratten.

Ba^{2+} -Alginatkapseln wurden aus dem hochgereinigten Alginat entsprechend der Verfahrensweise hergestellt, die in DE-OS 42 04 012 A1 beschrieben ist. Die Alginatkapseln besitzen einen mittleren Durchmesser von 200 μm bis 400 μm . Die Implantation erfolgte unter die Nierenkapsel der BB/OK-Ratten. Die Empfängertiere blieben normoglykämisch und zeigten keinen Verlust an Körpergewicht. Nach drei Wochen wurden die Tiere getötet, die Nieren herausgenommen und in Bouin'scher Lösung fixiert. Nach Einbettung in Paraffin folgte die Präparation von 7 μm -Schnitten. Jeder 20. Schnitt von zwei unabhängigen Individuen wurde zur histologischen Untersuchung herangezogen.

Das Ergebnis der Untersuchung für verschiedene Proben im Vergleich mit Rohalginat ist in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Resultat für zwei unabhängige Proben:

Probe	Ratte #	Histologische Beurteilung (Fibrose)	Endotoxingehalt einer 0,25%igen Lösung des Alginats
S1	V159	(+)	1 EU/ml
	V161	+	
S2	V454	0	3,5 EU/ml
Rohalginat	V12	++++	> 1000 EU/ml

(Legende:

0: keine Reaktion, (+): sehr schwache Reaktion, +: schwache Reaktion, ++++: sehr starke Fibrose)

Es zeigt sich, daß die Implantation mit erfindungsgemäßem Alginat keine oder nur eine sehr schwache Reaktion auslöst, wohingegen bei Implantation mit kommerziell angebotenem Rohalginat eine sehr starke Fibrose auftritt.

Der Endotoxingehalt, der charakteristisch für einen potentiellen Bakterienbefall ist, zeigt im Falle der hochgereinigten Alginate hervorragende, nahezu vernachlässigbare Werte, wohingegen der Vergleichswert des kommerziellen Rohalginats rd. tausendfach größer ist.

Am erfindungsgemäß hergestellten, hochgereinigten Alginat wurde auch unter Anwendung der folgenden Testverfahren festgestellt, daß keine Verunreinigungen von toxischen Substanzen gegeben ist. Die Testverfahren umfassen insbesondere fluoreszenzspektroskopische Verfahren und Endotoxin- oder Mitogenaktivitäts-Essays, wie sie von G. Klöck et al. in "Appl. Microbiol. Biotechnology" (Band 40, 1994, Seite 638 ff) und in "Biomaterials" (Band 18, 1997, Seite 707) beschrieben

sind, NMR-spektroskopische Verfahren, die Bestimmung des antioxidativen Potentials des hochgereinigten Alginats durch Ermittlung der Reaktion auf Zugabe von HOCl und über die Bestimmung der oxidativen Aktivität neutrophiler Granolocyten unter Zuhilfenahme der Chemolumineszenz (siehe K. Arnold in "Abhandlungen der sächsischen Akademie der Wissenschaften zu Leipzig", Band 58, 1997, Heft 5) und das Verfahren der "Free Flow Electrophoresis" wie es von U. Zimmermann et al. in "Electrophoresis" (Band 13, 1992, Seite 269) beschrieben ist. Eine toxische Verunreinigung wurde mit diesen Verfahren nicht bestimmt.

Nach den in der oben genannten Publikation von G. Klöck et al. (1997) angegebenen Verfahren wurde ferner das Verhältnis von Mannuron- zu Guluronsäure mit Hilfe der sogenannten "Circular Dichroismus-Spectroscopy" bzw. mit der IR-Spektroskopie ermittelt. Ferner wurde auch das Molekulargewicht über die Bestimmung der Viskosität ermittelt.

Die mit BA^{2+} vernetzten Kapseln aus Alginat besitzen eine hervorragende Elastizität, wie es mit Hilfe von Kompressionsmessungen nachgewiesen werden konnte.

Das beschriebene Verfahren zur Alginatgewinnung kann in Bezug auf das Fällungsmittel, die Wahl des Sedimentationsmittels, die Wahl des inerten Treibgases, das Fällungsverfahren und/oder das Vorgehen beim Einsammeln des ausgefällten Alginats modifiziert werden. Anstelle des zur Sedimentation eingesetzten Kieselgur kann auch jedes andere absorbierende Material wie Elektrographite, Granulate, Cellulose, poröse Recycling-Materialien in Pulver- oder Partikelform verwendet werden. Es ist auch möglich, zur Sedimentation ein mit einem absorbierenden Material beschichtetes Rührwerkzeug zu verwenden.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein hochgereinigtes Alginat, das als Mischpolymer aus Mannuronsäure und Guluronsäure in einem Verhältnis im Bereich von 1% bis 90% besteht, wobei das mittlere Molekulargewicht größer als 1000 kD ist. Bevorzugte Anwendungen eines derartigen, hochgereinigten Alginats sind die Transplantationschirurgie, bei der lebende Zellen in einer Alginatkapsel eingeschlossen und ohne die Auslösung immunologischer Reaktionen im Körper eines Lebewesens implantiert werden. Das hochgereinigte Alginat kann auch in den Gebieten der Lebensmittel- oder Textiltechnik zur Erhöhung der Verträglichkeit bestimmter Nahrungsmittel oder Stoffe eingesetzt werden. Es wird betont, daß das oben erläuterte erfindungsgemäße Verfahren auch zur Herstellung hochgereinigten Alginats mit geringerem Molekulargewicht bis zu 1000 kD geeignet ist.

Im folgenden wird ein Beispiel zur Transplantationschirurgie, nämlich die Mikrokapsulierung Langerhans'scher Inseln, beschrieben.

Isolierte Langerhans'sche Inseln wurden in einer Lösung von 0.9% NaCl und 0.5% des gereinigten Alginats suspendiert. Diese Suspension wurde durch eine Sprühdüse fein zertropft. Die Düse hat ein bewegliches inneres Hohlrohr (innere Düse) mit Lüranschluß (innerer Durchmesser 350 µm bzw. 2 mm), ein mittleres Hohlrohr (mittlere Düse) mit einem Durchmesser von 1 mm bzw. 3.5 mm und einen äußeren Kanal, der in einem justierbaren Luftfokussierkopf mündet. Diese Elemente wurden an einem Düsenkopf montiert, an dem sich Druckluft- und Lüranschluß befinden.

Die Inselsuspension in Alginat wird durch den zentralen Düsenkanal gedrückt. Durch den umgebenden Kanal wird eine Lösung von 2% des Alginats in 0.9% Kochsalzlösung appliziert. Bei den am Düsenausgang entstehenden Tropfen umschließt auf

17
17.03.1999

diese Weise die äußere Alginatlösung (2%) die in der 0.5%igen Alginatlösung suspendierten Inseln. Durch den äußeren, dritten Kanal wird Druckluft zugeführt, welche die Tropfen von der Düsenöffnung abschert. Die Druckluft wurde auf 30 bis 40 mbar (7 bis 8 L/min) eingestellt. Die Alginattropfen wurden in 40 mL Vernetzerlösung mit 20 mM BaCl_2 , 10 mM MOPS, 115 mM NaCl geliert. Die Kapseln wurden dann dreimal mit isotoner Kochsalzlösung gewaschen.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Gewinnung einer hochgereinigten Alginatzusammensetzung, mit den Schritten:
 - Extrahieren von Algenmaterial oder Rohalginat in einer Lösung mit einem Komplexbildner,
 - Sedimentieren von Zellbestandteilen und Partikeln mit einem porösen Bindemittel aus der Lösung,
 - Filtern der Lösung,
 - Ausfällen von Alginat aus der Lösung, und
 - Sammeln des gefällten Alginats.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem das Extrahieren in einer Sodalösung erfolgt.
3. Verfahren gemäß Anspruch 2, bei dem zum Extrahieren als Komplexbildner Ethylendiamentetraessigsäure und Na_2CO_3 verwendet werden.
4. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das Sedimentieren mit einem porösen Granulat auf der Basis von Kieselgur, Zellulose, Recycling-Materialien aus nachwachsenden Rohstoffen oder Elektrographit erfolgt.
5. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das Filtern mit Tiefenfiltern jeweils abnehmender Porengröße erfolgt.
6. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das Ausfällen von Alginat mit Alkohol erfolgt.

NO 311.99

7. Verfahren gemäß Anspruch 6, bei dem der Alkoholgehalt im Bereich von 10-30 % gewählt ist.
8. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das Sammeln des ausgefällten Alginats durch Aufschäumen aus der Lösung oder durch Dekantieren der Lösung erfolgt.
9. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das Entwässern des Alginats bei Raumtemperatur erfolgt.
10. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem nach dem Entwässern das Extrahieren, Filtern, Fällern und Entwässern mindestens einmal wiederholt wird.
11. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem als Algenmaterial Algenfrischmaterial oder kommerzielles Alginat verwendet wird.
12. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem als Algenmaterial bestimmte Organ- oder Gewebeteile von Algen verwendet werden.
13. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem als Algenmaterial Braunalgen verwendet werden.
14. Alginatzusammensetzung, die als Mischpolymer aus Mannuronsäure und Guluronsäure besteht, dadurch gekennzeichnet, daß im Mischpolymer ein Verhältnis von Mannuronsäure zu Guluronsäure im Bereich von 1% bis 90% gegeben ist und das mittlere Molekulargewicht des Mischpolymers größer als 1.000 kD ist.

11.03.11.99

15. Alginatzusammensetzung gemäß Anspruch 14, die nach einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13 hergestellt ist.
16. Verwendung einer Alginatzusammensetzung gemäß Anspruch 14 oder 15 zur Herstellung von Alginatkapseln oder -umhüllungen für die Transplantationschirurgie.

